

●原 著

喫煙者の気道炎症の評価における喀痰の有用性と禁煙の効果

長友 寛子

要旨：喫煙による気道の炎症反応を評価するため、喀痰使用の有用性を検討した。非喫煙者、健常喫煙者の喫煙中および禁煙 8, 12, 16 週後に喀痰の細胞内サイトカイン Interleukin (IL)-8, Interferon (IFN)- γ , Tumor Necrosis Factor (TNF)- α , Interleukin (IL)-10 の発現を免疫染色法にて検討した。喫煙者は非喫煙者と比較し、気道上皮細胞およびマクロファージ内における IL-8, IFN- γ , TNF- α の発現細胞の割合が有意に多かった。一方 IL-10 の発現は有意に少なかった。禁煙前後を比較すると、IL-8 の発現は禁煙 16 週後に、IFN- γ の発現は禁煙 12 から 16 週後に有意に減少した。TNF- α の発現は禁煙 16 週後までは変化を認めなかった。また、IL-10 の発現は禁煙 16 週後に有意に増加した。いずれのサイトカインも気道上皮細胞およびマクロファージ内の発現変化は類似傾向を示した。以上の結果より喫煙および禁煙による気道炎症の評価に喀痰使用が有用であると考えられた。

キーワード：喀痰、喫煙、禁煙、サイトカイン

Sputum, Smoking, Smoking cessation, Cytokine

緒 言

喫煙による長期の反復刺激は、喫煙者に気道の炎症を引き起こし¹⁾、一部症例において慢性気管支炎や肺気腫へと進展させる²⁾。一方、禁煙はその気道炎症を軽減し、病変の進展を抑制すると考えられている³⁾。従って気道の炎症を経時的に評価することは、喫煙による慢性的な気道病変の進展の程度を把握する上で重要である。

通常、気道の炎症は気管支洗浄液や気管支擦過および生検などにより評価されるが^{4)~6)}、これらの方法は侵襲的かつ費用もかかり、多数例の長期的な評価には不適である。一方、喀痰検査は侵襲も少なく⁷⁾反復可能な方法であるため、経時変化の把握には適切な方法と考えられる。気管支喘息の報告においても、喀痰と気管支洗浄および気管支生検の好酸球数比率は相関することが認められ⁸⁾、喀痰による気道炎症評価が有用であることが示されている。また慢性気管支炎、肺気腫患者、喫煙者における誘発喀痰を用いた検討では、好中球性気道炎症の存在が指摘されている⁹⁾。

通常、気道炎症の評価にはマクロファージや好中球が用いられるが¹⁰⁾¹²⁾、これら炎症細胞は肺胞レベルにも存在し、必ずしも気道病変のみを反映しているとは限らない。そこで本研究では気道上皮細胞による評価も加え、総合的に気道炎症の評価を行うことを考えた。

本研究では喫煙および禁煙後の気道炎症のモニタリングとしての喀痰の有用性を検討するため、喫煙者および禁煙前後において気道炎症のバイオマーカーと考えられるサイトカイン IL-8, TNF- α , IFN- γ , IL-10 の発現を喀痰中の気道上皮細胞およびマクロファージを用いて検討した。

対象および方法

1) 対象

一日 30 本、10 年以上の喫煙歴を有する 30 人の健常喫煙者(平均年齢 42.9 歳: 29 歳から 71 歳、女性 15 人、男性 15 人)を対象とした。肺結核、肺癌、気管支喘息の既往を有する者、気管支拡張剤やステロイド剤の吸入薬にて治療されている者は除外した。喫煙者 30 人のうち、無作為に選ばれた 20 人は禁煙し (quitting group)、残り 10 人は喫煙を継続した (continuing group)。喀痰は禁煙直前 (0 weeks) および、禁煙後 8, 12, 16 週目にそれぞれ採取した。呼気中 CO 濃度により禁煙を確認した。また、コントロールは 8 人の健常非喫煙者とした。

2) 喀痰処理

早朝、連続 3 日間の喀出痰をサコマノ液に 4℃ にて保存し、4 日目に回収した。ブレンダー内で 3 分間攪拌後、1400 bpm、15 分間遠心分離し、細胞成分にて塗抹標本作製した。

3) 免疫染色

標本は 75%, 95%, 100% メタノールにて順次 1 分間ずつ固定した。サイトカインの免疫染色は Kotecha ら¹³⁾

〒807-8555 福岡県北九州市八幡西区医生ヶ丘 1-1
産業医科大学呼吸器科

(受付日平成 12 年 10 月 16 日)

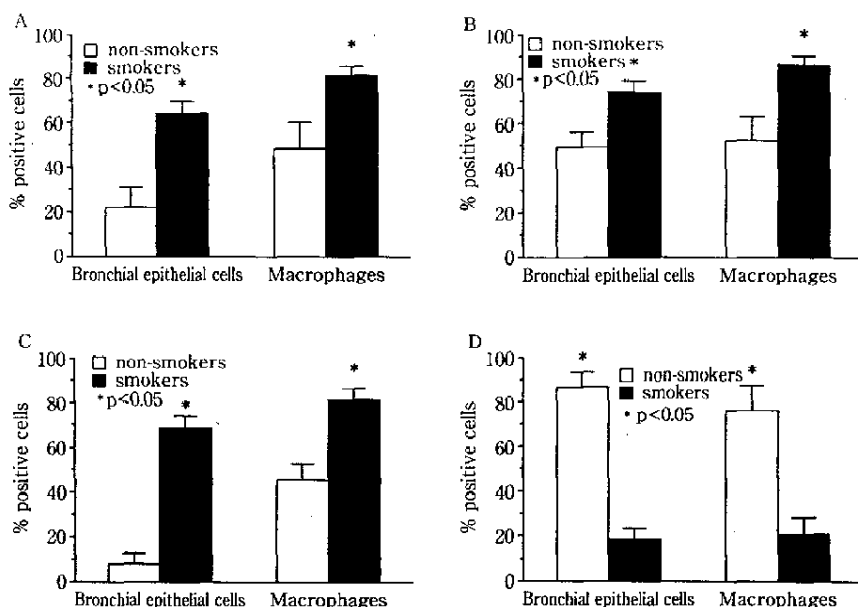


Fig. 1 Effects of smoking on cytokine expression in bronchial epithelial cells and macrophages. (A) IL-8. (B) IFN- γ . (C) TNF- α . (D) IL-10. In smokers, the numbers of cells positive for IL-8, IFN- γ and TNF- α were significantly elevated. In contrast, the number of IL-10-positive cells was greatly decreased.

の方法に基づいて行ない、抗ヒト、ヤギポリクローナル抗体 (IL-8, TNF- α , IFN- γ , IL-10; R & D systems 社製) を一次抗体として使用した。標本は 1 mM レバミソールとトリス塩酸緩衝液で希釈した 10% 正常兔血清にてそれぞれ 15 分ずつ浸漬させた。24 時間一次抗体 (TNF- α : 1:50 希釈, IL-8, IFN- γ , IL-10: 1:100 希釈) にて反応させた後、二次抗体 (抗ヤギ家兔抗体, SIGMA 社製) にて 2 時間反応させた。発色剤として Fast Red/Naphtol (SIGMA 社製) を使用し、核染色剤としてヘマトキシリン (SIGMA 社製) を使用した。上記一次抗体のみを使用せず染色した標本を、コントロールとした。同一喫煙者の禁煙後 0 から 16 週までの標本は、同時に染色を行った。

4) 分析

少なくとも 25 個以上の気道上皮細胞と 50 個以上のマクロファージを含む標本を対象とした。免疫染色で無または弱染色の細胞は陰性、中等度以上の染色は陽性とし、陽性細胞の割合を算定した¹⁴⁾。

5) 統計

喫煙者と非喫煙者のサイトカイン発現の比較には *t* 検定を、禁煙前後の比較には Dunnett's post-hoc procedure をそれぞれ用いた。統計学的な有意差を *p* value < 0.05 とした。

結 果

喀痰中マクロファージは全例において必要細胞数認めたものの、気道上皮細胞において細胞数が不足した症例を認めた。その症例を除外したため、喫煙者 30 人中 14 人 (平均年齢 42.4 歳; 女性 8 人, 男性 6 人)、非喫煙者 8 人中 5 人がサイトカイン発現の検討の対象となった。また禁煙前後の比較では、喫煙者中禁煙者 6 人 (quit group, 平均年齢 48.7 歳)、喫煙継続者 3 人 (continue group, 平均年齢 44.3 歳) が検討の対象となった。

1) 喫煙者と非喫煙者におけるサイトカイン発現の比較

非喫煙者と比較すると、喫煙者の気道上皮細胞およびマクロファージにおける IL-8 (Fig. 1A), IFN- γ (Fig. 1B), TNF- α (Fig. 1C) 発現細胞の割合は有意に多かった (*p* < 0.05)。逆に IL-10 (Fig. 1D) の発現は有意に少なかった (*p* < 0.05)。結果は提示していないが、サイトカイン発現の程度と、Brinkman Index や喫煙年数との間に相関関係は認められなかった。

2) 禁煙前後におけるサイトカイン発現の比較

IL-8 (Fig. 2A, Fig. 3A) 発現細胞の割合は、気道上皮細胞およびマクロファージとも、禁煙 12 週後より減少傾向を示し、16 週後で禁煙前と比較し有意差を認め (*p* < 0.05)、非喫煙者と同程度となった。IFN- γ (Fig. 2B) の発現は禁煙 8 週後より減少傾向を示し、気道上皮細胞

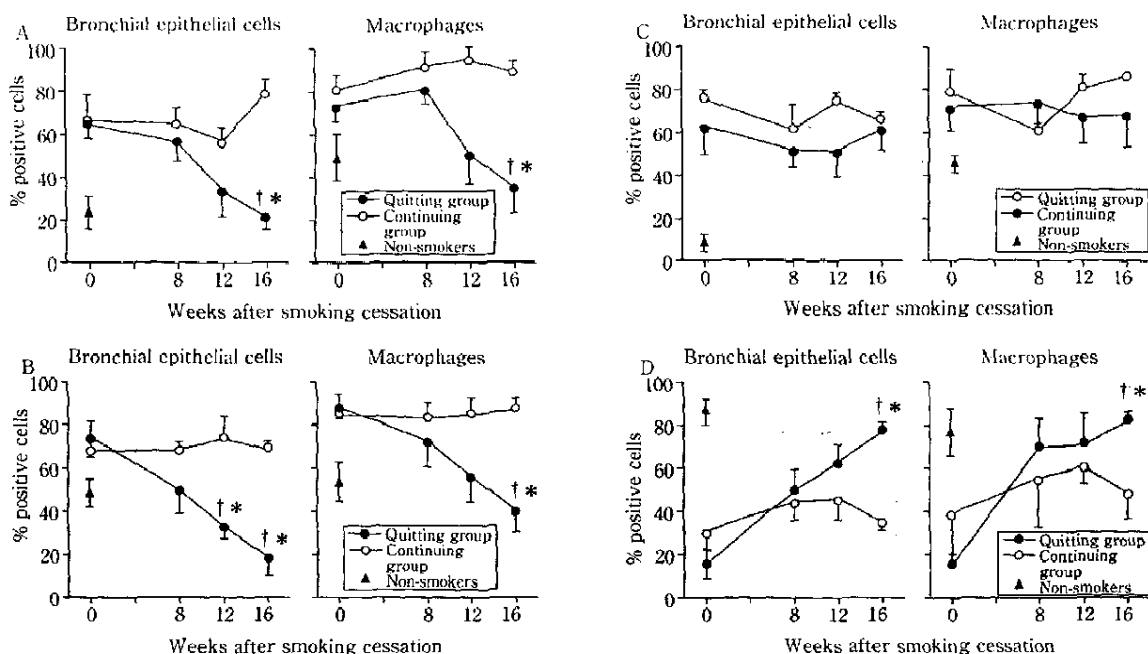


Fig. 2 Time course of changes in cytokine expression after smoking cessation. (A) IL-8. (B) IFN- γ . (C) TNF- α . (D) IL-10. * $p < 0.05$ versus continuing group. † $p < 0.05$ versus 0 weeks. The percentage of IL-8 and IFN- γ -positive cells were significantly decreased by the 12th to the 16th week after smoking cessation, that of TNF- α -positive cells was unchanged even at 16 weeks post-cessation, and that of IL-10-positive cells was significantly increased by 8 weeks post-cessation.

では12週後より、マクロファージでは16週後で有意差を認めた ($p < 0.05$)。しかし TNF- α (Fig. 2C) の発現は気道上皮細胞およびマクロファージいずれにおいても殆ど変化を認めなかった。IL-10 (Fig. 2D, Fig. 3B) の発現は禁煙8週後より増加傾向を示し、16週後で有意差を認め ($p < 0.05$)、非喫煙者と同程度となった。いずれのサイトカインも、気道上皮細胞およびマクロファージ内の発現の変化は類似した傾向を示した。

考 察

1) 喫煙者と非喫煙者におけるサイトカイン発現の比較

喫煙者のマクロファージ内の IL-8, TNF- α , IFN- γ は非喫煙者に比べ発現が多く、IL-10 では発現が少なかった。好中球の遊走因子である IL-8 に関しては、喫煙者の気管支肺胞洗浄液 (BALF) や喀痰中の IL-8 濃度が上昇したことが報告されている^{11,12)}。また McCrea ら¹³⁾ は BALF 中の IL-8 濃度が気道炎症のバイオマーカーとなり得ること、および慢性閉塞性肺疾患の罹患率と相関することを報告しており、これらの報告は我々の結果と一致すると思われる。一方、喫煙者でのマクロファージ内の IFN- γ の発現に関して、現在まで報告はない。しか

し、炎症性サイトカインである IFN- γ の¹⁴⁾増加は、喫煙による気道炎症の進展に寄与することが示唆される。

TNF- α に関して、BALF 中の TNF- α 濃度の低下が報告されているが¹⁵⁾、本研究ではマクロファージ内の発現の増加を認めた。なぜこのような差異を認めたか不明である。しかし喫煙者の Interleukin-1 について、細胞内の発現の亢進と細胞外分泌の低下が報告され、サイトカイン放出の障害を示唆している¹⁶⁾。TNF- α にも類似した現象がおこることも考えられた。

抗炎症サイトカインである IL-10 の発現は少なかった。Takanashi ら¹⁶⁾ は健康喫煙者の喀痰中 IL-10 発現の低下、および喀痰上清中の IL-10 濃度の低下を報告しており、これらは本研究の結果と合致する。IL-10 は、炎症作用抑制因子の低下という面から気道炎症の進展に作用していることが伺われる。しかし喫煙者の肺マクロファージからの IL-10 分泌が、*in vitro* において亢進していたことが報告されている¹⁷⁾。この報告と本研究の結果との差異について明らかではない。今後喀痰上清中のサイトカイン濃度の測定も含め、サイトカイン分泌量を総合的に検討していく必要があると思われる。

2) 禁煙前後におけるサイトカイン発現の比較

16週間の禁煙によりマクロファージ内の IL-8, IFN- γ

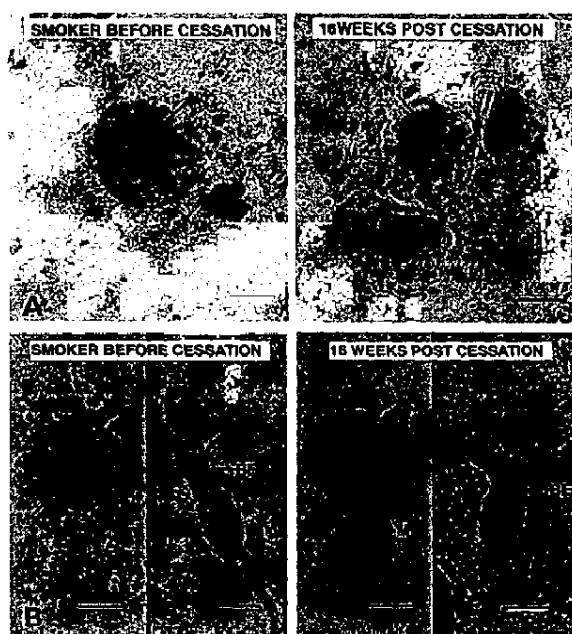


Fig. 3 Immunohistochemical examination of cytokine expression. Fast Red-Naphtol was used as the chromogen. (A) Macrophages (M) from a smoker before (left) and 16 weeks after cessation (right). Note the decrease in staining for IL-8 in cytoplasm (arrow) after cessation. (B) Bronchial epithelial (BE) cells and macrophages (M) from a smoker before (left) and at 16 weeks after cessation (right). Note the increase in staining for IL-10 in the cytoplasm (arrow). N: Nucleus. Bar = 20 μ m.

の発現は低下し、IL-10の発現は増加し、非喫煙者とはほぼ同程度となった。Rennardら¹⁸⁾は2カ月間の禁煙によりBALF中の気道炎症が減少したこと、Swanら¹⁹⁾は禁煙後2カ月より喀痰中のマクロファージが減少したことを報告している。これらの報告は2カ月で禁煙の効果が出ることを示しており、我々の禁煙16週以内でのサイトカインの発現の変化を支持すると思われる。一方Turatoら²⁰⁾は慢性気管支炎患者に平均13カ月の禁煙を行ったにもかかわらず症状が持続しており、気管支生検により炎症細胞比率に変化を認めなかったことを報告している。この報告は、本研究の健常喫煙者と異なり慢性気管支炎患者が対象であった。従って気道の再構築の有無が短期間の禁煙効果に影響することが考えられた。TNF- α に関しては禁煙16週まで変化はほとんど認められなかった。嚢胞肺線維症患者の喀痰中Interleukin-6濃度は病変の伸展、改善に一致するが、TNF- α は変化がなかったことが報告されている²¹⁾。炎症の回復時にTNF- α の反応が遅延した可能性があり、TNF- α の分泌の検

討には、今後喀痰中の濃度も含め追試が必要と思われる。

3) 気道上皮細胞について

喫煙者と非喫煙者との比較および禁煙後の変化はIL-8、TNF- α 、IFN- γ 、IL-10のいずれの発現もマクロファージの変化と同様な傾向を示した。このようなマクロファージと気道上皮細胞の喫煙および禁煙による反応の類似性は、両者共に気道炎症に深く関与すると考えられ、気道炎症の評価に有用であることが示唆された。

本研究により喀痰中の気道上皮細胞およびマクロファージ内のサイトカインの発現は、喫煙および喫煙中止による気道炎症の変化を反映することが明らかとなった。このことは、喫煙による気道炎症のモニタリングとして喀痰が有効であることを示している。今回の検討では症例数が少なく、喫煙および禁煙による喀痰を用いた気道炎症におけるサイトカインの役割については、さらなる検討が必要であると思われる。

謝辞：御指導、御協力頂いたウイスコンシン州立大学 Dr. LA Thet, 産業医科大学 城戸優光教授、森本泰夫教授に深謝致します。

文 献

- Adesina AM, Vallyathan V, Craighead JE, et al: Bronchiolar inflammation and fibrosis associated with smoking. *Am Rev Respir Dis* 1991; 143: 144-149.
- Doll R, Peto R: Mortality in relation to smoking: 20 years observation on male British doctors. *Br Med J* 1976; 2: 1525-1535.
- Fletcher CM, Peto R: The natural history of chronic airflow obstruction. *Br Med J* 1977; 1: 1645-1648.
- McCrea KA, Ensor JE, Hasday JD, et al: Altered cytokine regulation in the lungs of cigarette smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 150: 696-703.
- Turato G, Stefano AD, Saetta M, et al: Effect of smoking cessation on airway inflammation in chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152: 1262-1267.
- Soliman DM, Twigg III HL: Cigarette smoking decreases bioactive interleukin-6 secretion by alveolar macrophages. *Am J Physiol* 1992; 263: L 471-478.
- Kuschnier WG, D'Alessandro A, Blanc PD, et al: Dose-dependent cigarette smoking-related inflammatory response in healthy adults. *Eur Respir J* 1996; 9: 1989-1994.
- Hasday JD, McCrea KA, Bleeker ER, et al: Dysregulation of airway cytokine expression in chronic obstructive pulmonary disease and asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 150: S 54-S 58.

- 9) Popov T, Gottschalk R, Hargreave FE, et al: The evaluation of a cell dispersion method of sputum examination. *Clin Exp Allergy* 1994; 24: 778—783.
- 10) Grootendorst DC, Sont JK, Sterk PJ, et al: Comparison of inflammatory cell counts in asthma: induced sputum versus bronchoalveolar lavage and bronchial biopsies. *Clin Exp Allergy* 1997; 27: 769—779.
- 11) Keatings VM, Scott DM, Barnes PJ, et al: Differences in Interleukin-8 and tumor necrosis factor- α in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153: 530—534.
- 12) Hunninghake GW, Crystal RG: Cigarette smoking and lung destruction. *Am Rev Respir Dis* 1983; 128: 833—838.
- 13) Kotecha S, Wilson L, Shaw RJ, et al: Increase in interleukin (IL)-1 β and IL-6 in bronchoalveolar lavage fluid obtained from infants with chronic lung disease of prematurity. *Pediatr Res* 1996; 40: 250—256.
- 14) Mueller R, Chanez P, Bullock GR, et al: Different cytokine patterns in bronchial biopsies in asthma and chronic bronchitis. *Respir Med* 1996; 90: 79—85.
- 15) 宮坂信之: 炎症とサイトカイン. 笠倉新平編, サイトカイン. 日本医学館, 東京, 1997: 293—299.
- 16) Takanashi S, Hasegawa Y, Okamura K, et al: Interleukin-10 level in sputum is reduced in bronchial asthma, COPD and in smokers. *Eur Respir J* 1999; 14: 309—314.
- 17) Lim S, Barnes PJ, Chung KF, et al: Balance of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 from alveolar macrophages in cigarette smokers: Regulation by Interleukin-10. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 1355—1360.
- 18) Rennard SI, Daughton D, Thompson AB, et al: Short-term smoking reduction is associated with reduction in measures of lower respiratory tract inflammation in heavy smokers. *Eur Respir J* 1990; 3: 752—759.
- 19) Swan GE, Hodgkin JE, Peters J, et al: Reversibility of airways injury over a 12-month period following smoking cessation. *Chest* 1992; 101: 607—612.
- 20) Nixon LS, Yung B, Shale DJ, et al: Circulating immunoreactive interleukin-6 in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 1764—1769.

Abstract

Use of Expecterated Sputum to Assess Airway Inflammation of Smoking and Its Cessation

Hiroko Nagatomo

Department of Respiratory Disease, University of Occupational and Environmental Health,
Japan, 1-1, Iseigaoka, Yahatanishi, Kitakyushu, 807-8555, Japan

To investigate the usefulness of expecterated sputum in the assessment of airway inflammation by smoking, I examined cytokine expression in the sputum of healthy smokers and non-smokers, and compared them before, and at 8, 12 and 16 weeks after, cessation of smoking. Four cytokines, interleukin (IL)-8, interferon (IFN)- γ , tumor necrosis factor (TNF)- α , and IL-10, were assessed by immunohistochemistry. In smokers, the percentage of bronchial epithelial (BE) cells and macrophages with high intracellular contents of the pro-inflammatory cytokines IL-8, IFN- γ and TNF- α , were significantly increased in comparison with non-smokers. In contrast, expression of IL-10 was significantly decreased in smokers. After smoking cessation, expression of IL-8 was significantly decreased by the 16th week, that of IFN- γ was significantly decreased by the 12th to the 16th week, but that of TNF- α was unchanged even at 16 weeks post-cessation, and that of IL-10 was significantly increased at that time. Cytokine expression in BE cells was similar to that in macrophages. From the data, we concluded that expecterated sputum is useful for assessing airway inflammation due to smoking and for following the series of changes that follow smoking cessation.